玉屏风多糖对草鱼肠黏膜形态结构及主要免疫与吸收相关基因表达的影响

尹福泉[1] 吴勇亮[2] 刘明珠[1,3] 谭淑雯[2] 杨 映[2] 于 辉[2*]

（1.广东海洋大学农学院，湛江 524088；2.佛山科学技术学院生命科学与工程学院，佛山 528231；

3.广州中国科学院先进技术研究所，广州 511458）

摘 要：本试验旨在探讨不同比例玉屏风多糖对草鱼肠黏膜形态结构及主要免疫与吸收相关基因表达的影响。试验选择 750 尾平均体重为（74.50±2.50） g 的健康草鱼，随机分为 5 组（每组 6 个重复，每个重复 25 尾）。对照组（Ⅰ组）投喂基础饲料，试验组（Ⅱ～Ⅴ组）投喂在基础饲料基础上分别添加 0.8、1.2、1.6、2.0 g/kg 玉屏风多糖的试验饲料。预试期 7 d，正试期 28 d。结果表明：1）与对照组相比，在试验第 14 天时，Ⅴ组的隐窝深度显著降低（$P<0.05$），而绒腺比则显著提高（$P<0.05$）。2）对照组相比，在试验第 7 天时，Ⅲ和Ⅳ组头肾中白介素-2(*IL*-2) mRNA 相对表达量显著或极显著提高（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ组头肾中干扰素 γ(*IFN*-γ)mRNA 相对表达量均极显著提高（$P<0.01$），Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ组肠道中钠葡萄糖转运蛋白 1(*SGLT*-1)和葡萄糖转运蛋白 2(*GLUT*-2)mRNA 相对表达量显著或极显著提高（$P<0.05$ 或 $P<0.01$））。3）与对照组相比，在试验第 14 天时，Ⅳ和Ⅴ组头肾中 *IL*-2 mRNA 相对表达量极显著提高（$P<0.01$），Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ组头肾中 *IFN*-γ mRNA 相对表达量显著或极显著提高（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ组肠道中 *SGLT*-1 和 *GLUT*-2 mRNA 相对表达量极显著提高（$P<0.01$）。4）与对照组相比，在试验第 21 天时，Ⅳ组头肾中 *IL*-2 mRNA 相对表达量显著提高（$P<0.05$），Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ组头肾中 *IFN*-γ mRNA 相对表达量极显著提高（$P<0.01$），Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ组肠道中 *SGLT*-1 和 *GLUT*-2 mRNA 相对表达量显著或极显著提高（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。5）与对照组相比，在试验第 28 天时，Ⅳ和Ⅴ组头肾中 *IL*-2 mRNA 相对表达量极显著

收稿日期：2017-03-30
基金项目：国家科技计划项目（2015GA780004）；佛山市科技创新专项资金（2013AG10005）；广东海洋大学创新强校项目（GDOU2016050208）广东省草鱼疾病防控工程技术研究中心建设项目[粤科函产学研字〔2016〕176 号，粤科函产学研字〔2015〕1487 号]
作者简介：尹福泉（1972-），男，内蒙古通辽人，副教授，博士，主要从事动物营养与饲料科学研究。E-mail: yinfuquan01@163.com
*通信作者：于 辉，教授，硕士生导师，E-mail: yu71hui@126.com

提高（$P<0.01$），Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ组头肾中 *IFN*-γ mRNA 相对表达量显著或极显著提高（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ组肠道中 *SGLT*-1 mRNA 相对表达量显著或极显著提高（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。综上所述，在草鱼饲料中添加一定量的玉屏风多糖能改善肠黏膜形态结构，促进肠道中 *SGLT*-1 和 *GLUT*-2 基因的表达，调控头肾中 *IL*-2 和 *IFN*-γ 基因的表达，从而提高肠道吸收功能、增强机体免疫力。从节约饲养成本出发，草鱼饲料中玉屏风多糖最适添加量为 1.6 g/kg。

关键词：草鱼；玉屏风多糖；肠道绒毛；白介素-2；干扰素 γ；钠葡萄糖转运蛋白 1；葡萄糖转运蛋白 2

中图分类号：S963　　　　　文献标识码：A　　　　　文章编号：

草鱼与鲢鱼、青鱼、鳙鱼并称我国四大家鱼，因其肉质鲜美和营养价值高等特点深受广大消费者的青睐并且被广泛养殖。随着我国水产养殖业的不断扩大，高密度、集约化的养殖模式导致草鱼病害的发生以及流行[1]。在这过去的 20 年里，大量的兽药作为预防性抗生素被投放到水环境中，这种滥用抗生素行为将导致水环境中耐药细菌的出现和鱼类病原菌耐药性增强，导致土壤细菌、动物病原菌和人体病原菌间的耐药基因转移，导致沉积物和水层细菌群落的改变[2]，这使得提高草鱼免疫力、减少抗生素的使用成为主要的研究方向。近些年的研究表明，中药多糖作为饲料添加剂，具有毒副作用小、无残留等优点，在鱼类的生长、免疫以及消化性能等方面有着广阔的应用前景[3]。

玉屏风是由黄芪、白术、防风这 3 味中药组成[4]。其作用有益气固表、补脾实卫、止汗的功效。玉屏风多糖是将黄芪、白术、防风按一定比例混合后通过浸泡、水煮、加热浓缩、冷却离心以及醇沉法提取得到[5]。玉屏风散各组成药物的多糖成分均已被证实对机体免疫系统产生影响[6-9]。Yuan 等[10]给鲤鱼注射不同剂量的黄芪多糖，结果发现头肾中的白介素（*ILs*）随着黄芪多糖注射量的增加其表达量也增加；毛俊浩的试验表明白术多糖可以促进小鼠淋巴细胞分泌白介素 2（IL-2）[11]；朱南山等[12]发现白术多糖可以提高猪血淋巴细胞干扰素 γ（INF-γ）的分泌水平，纠正 T 细胞亚群分泌紊乱的状态；高鸿霞等[13]推测防风多糖提高自然杀伤（NK）细胞活性作用机制与促进 IL-2 活性、诱导淋巴细胞高表达 IL-2 有关。以上研究表明玉屏风多糖对机体的免疫性能有一定的改善作用。本试验在前人研究的基础上探讨不同比例玉屏风多糖对草鱼肠道绒毛形态及头肾中免疫相关基因白介素 2

（IL-2）、干扰素 γ（INF-γ）和肠道中吸收相关钠葡萄糖转运蛋白 1（*SGLT*-1）、葡萄糖转运蛋白 2（*GLUT*-2）mRNA 相对表达量的影响，从而为玉屏风多糖在水产养殖中的应用提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物与饲料

草鱼：由佛山市南海百容水产良种有限公司提供。

玉屏风多糖：购自佛山德众药业有限公司，经实验室测定其总还原糖、粗蛋白质、粗脂肪、粗灰分、水分和粗纤维的含量分别为 34.2%、18.52%、0.71%、8.86%、8.21%和 0.67%。

基础饲料组成及营养水平见表 1。

表 1 基础饲料组成及营养水平（干物质基础）

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (DM basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
鱼粉 Fish meal	4.0
豆粕 Soybean meal	27.3
米糠 Rice bran	9.6
菜籽粕 Rapeseed meal	26.4
面粉 Wheat flour	24.7
豆油 Soybean oil	1.5
维生素预混料 Vitamin premix[1)]	1.5
矿质元素预混料 Mineral premix[2)]	1.5
贝壳粉 Shell powder	1.7
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.8

合计 Total	100.0
营养水平 Nutrient levels	
粗蛋白质 CP	34.66
粗脂肪 EE	4.74
粗纤维 CF	6.80
粗灰分 Ash	8.94
水分 Moisture	10.00

1)维生素预混料为每千克饲料提供 The vitamin premix provided the following per kilogram of the diet：VA 150 000 IU，VD_3 30 000 IU，VE 750 mg，VK_3 150 mg，叶酸 folic acid 2.5 g，烟酰胺 nicotinamide 50 g，泛酸 pantothenic acid 40 g，肌醇 inositol 75 g。

2)矿物元素预混料为每千克饲料提供 The mineral premix provided the following per kilogram of the diet：Fe 2.5 g，Cu 0.075 g，Zn 0.75 g，Mn 0.5 g，Mg 5 g，I 22.5 mg，Se 3.5 mg，Co 7.5 mg。

1.2 试验设计与饲养管理

试验选择 750 尾健康、平均体重为（74.50±2.50） g 的草鱼，随机分为 5 组（每组 6 个重复，每个重复 25 尾）。对照组（Ⅰ组）投喂基础饲料，试验组（Ⅱ～Ⅴ组）投喂在基础饲料基础上分别添加 0.8、1.2、1.6、2.0 g/kg 玉屏风多糖的试验饲料。养殖试验统一选用 200 L 容积的养殖桶（桶体直径 51 cm、口径 40 cm、高度 98 cm），24 h 通氧，3 d 换 1 次水（每次为总水量的 1/3）。预试期 7 d，正试期 28 d，按照日常生产方法投喂，每日 09:00 和 17:00 各投喂 1 次饲料，每次投食量为鱼群总重量的 4%。

1.3 试验样品的采集与测定方法

1.3.1 肠道切片样品的采集与处理

分别在正式试验开始后的第 13、27 天 08：00 开始禁食，第 14、28 天 08：00 每个重复随机选取 1 尾（每个组 6 尾）草鱼，在冰面上进行解剖，快速取出肠道，剔除肠道周围多余的脂肪，切取长度为 1 cm 左右的草鱼前肠道，用 pH 为 7.2～7.4 的磷酸盐缓冲液冲洗肠道，于卡诺固定液中（无

水酒精 60 mL，氯仿 30 mL，冰醋酸 10 mL）固定，用石蜡包埋、切片，采用苏木精-伊红（HE）染色。用显微镜显示各组肠黏膜形态结构，测定肌层厚度，并在每个组织切片上选取 5 根走向平直、伸展良好的绒毛，用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件测定绒毛高度、隐窝深度，计算绒腺比（V/C），即绒毛高度/隐窝深度。

1.3.2　主要免疫吸收指标基因表达测定样品的采集与处理

在正式试验的第 7、14、21 和 28 天时，08：00 投喂，09：00 每组分别随机选取 5 尾草鱼，在冰面上进行解剖，快速取出肠道，剔除肠道周围多余的脂肪，用 pH 为 7.2～7.4 的磷酸盐缓冲液冲洗肠道后，快速称取 0.2 g 的前肠，于已装有 RNA fix 的 Ep 管中保存，24 h 后将管中 RNA fix 液弃掉，-80 ℃保存。草鱼头肾的取样方式同前肠。

1.3.3　mRNA 相对表达量的检测

总 RNA 的提取与反转录参照 PrimeScript^{TM} RT Reagent Kit 试剂盒的说明进行。

根据 NCBI 上公布的草鱼 β2m 基因序列（GenBank 登录号：AB190815.1）设计相对定量内参基因引物，根据 NCBI 上公布的草鱼 IL-2 基因序列（GenBank 登录号：AF486820.1）、草鱼 IFN-γ 基因序列（GenBank 登录号：FJ695519.1）、鲤鱼 SGLT-1 基因序列（GenBank 登录号：JN867793.1）和斑马鱼的 GLUT-2 基因序列（GenBank 登录号：NM_001042721.1）设计相应的荧光定量引物（表 2）。以上所有引物由上海生物工程有限公司引物合成部（广州分公司）进行合成。

表 2　实时荧光定量 PCR 引物

Table 2　Primer sequences for RT-qPCR

基因 Genes	引物序列 Primer sequences （5´-3´）	产物长度 Product length/bp	退火温度 Annealing temperature/℃
β2m	F：GGCTGGCAGTTTCACCTCAC R：CCACCCTTTGTCTGGCTTTG	150	60
白介素-2 *IL*-2	F：AGACGTGTCTAAACCGCTGA	145	55

	R：TTTGGTTTGATACTGCGTGG		
干扰素γ *IFN*-γ	F：CTCTGCAAGAACATTATAAA R：TCCCTTCTTTATGCTCAGAC	176	55
钠葡萄糖转运蛋白1 *SGLT*-1	F：GTTCATGCTGTTTCTGATCG R：TCCCACCAACAGACCAATAC	203	55
葡萄糖转运蛋白2 *GLUT*-2	F：CGACACAAGGGTGAAAATGA R：CGAAATGAAGGCAGAAAAGG	247	55

F 代表正向引物，R 代表反向引物。

F represented forward primer, R represented reverse primer.

采用 SYBR® Premix Ex Tap™ Ⅱ试剂盒进行实时定量 PCR 试验。反应程序为：第 1 步，95 ℃ 30 s；第 2 步，95 ℃ 5 s，55 ℃ 20 s，72 ℃ 34 s，共 40 个循环；第 3 步，绘制熔解曲线。反应体系为 20 μL，包括：2×SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ 10 μL，正向引物(10 μmol/L) 0.8 μL，反向引物(10μmol/L) 0.8 μL，50× ROX Peference Dye Ⅱ 0.4 μL，cDNA 模板 2 μL，ddH$_2$O 6 μL。

目的基因的 mRNA 的相对表达量采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算。Ct 值为荧光量与荧光阈值线交叉时的循环数，模板的起始拷贝数越多，Ct 值越小。计算公式如下：

△Ct（试验组）=试验组目的基因 Ct－试验组内参基因 Ct。

△Ct（对照组）=对照组目的基因 Ct－对照组内参基因 Ct。

△△Ct=平均值△Ct（试验组）－平均值△Ct（对照组）。

目的基因 mRNA 相对表达量（试验组/对照组）=$2^{-\triangle\triangle Ct}$。

比较 2-△△Ct 值的大小，就可以知道目的基因相对表达量的高低，从而得出目的基因 mRNA 的相对表达量差异。

1.4　试验数据的处理与分析

试验数据采用 Excel 2010 进行初步处理，采用 SPSS 19.0 软件中的单因素方差分析（one-way ANOVA）进行显著性检验，并采用 Duncan 氏法进行多重比较，结果以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 玉屏风多糖对草鱼肠黏膜形态结构的影响

由表 3 可知，在草鱼饲料中添加不同比例的玉屏风多糖对草鱼的绒毛高度无显著影响（$P>0.05$）。第 14 天时，各试验组的隐窝深度均低于对照组，其中试验Ⅴ组与对照组的差异到达显著水平（$P<0.05$），且显著低于试验Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组（$P<0.05$）。试验第 14 天时，各试验组的绒腺比均高于对照组，其中试验Ⅴ组与对照组的差异到达显著水平（$P<0.05$），且显著高于试验Ⅱ组（$P<0.05$）；试验第 28 天时，各试验组的绒腺比稍低于对照组，但差异均不显著（$P>0.05$）。试验第 14 天和 28 天时，各试验组的肌层厚度均高于对照组，但差异均不显著（$P>0.05$）。

表 3 玉屏风多糖对草鱼肠黏膜形态结构的影响

Table 3 Effects of *Yupingfeng* polysaccharide on intestinal mosal morphology of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

项目 Items	时间 Time	组别 Groups				
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
绒毛高度 Villus height/μm	第 14 天 Day 14	559.80±32.74	549.61±40.62	558.29±39.64	553.30±36.76	568.61±12.83
	第 28 天 Day 28	694.13±35.21	653.92±38.23	662.33±25.49	684.02±27.57	673.65±29.72

隐窝深度 Crypt depth/µm	第 14 天 Day 14	55.17±5.42[a]	49.57±6.33[a]	44.07±12.24[a]	42.98±10.20[a]	37.94±6.49[b]
	第 28 天 Day 28	46.17±4.48	47.82±6.08	48.33±5.06	48.36±7.98	45.32±6.45
绒腺比 V/C	第 14 天 Day 14	10.22±1.29[b]	11.14±0.74[b]	13.12±2.48[ab]	13.29±2.68[ab]	15.26±2.37[a]
	第 28 天 Day 28	15.31±0.94	13.79±1.45	13.77±1.04	14.50±3.27	15.07±2.32
肌层厚度 Muscularis thickness/µm	第 14 天 Day 14	93.70±29.35	106.83±28.11	113.53±37.49	114.22±24.72	101.70±20.30
	第 28 天 Day 28	115.74±8.08	131.61±7.58	128.11±19.35	112.83±10.00	117.42±7.58

同行数据肩标相同或无字母表示差异不显著（*P*>0.05），不同字母表示差异显著（*P*<0.05）。

Values in the same row with the same or no letter superscripts indicated no significant difference (*P*>0.05), while with different letter superscripts indicated significant difference (*P*<0.05).

2.2 玉屏风多糖对免疫相关基因 *IL*-2 和 *IFN*-γ 在草鱼头肾中不同时期的 mRNA 相对表达量的影响

由表 4 可知，玉屏风多糖对 *IL*-2 和 *IFN*-γ 基因在草鱼头肾中不同时期的 mRNA 相对表达量具有一定影响，以对照组为基础，通过计算试验组与对照组的差异倍数，可以看出玉屏风多糖对草鱼头肾中 *IL*-2 和 *IFN*-γ 这 2 种免疫基因的 mRNA 相对表达量均有提高作用。

对于 *IL*-2 的 mRNA 相对表达量，在试验第 7 天时，Ⅲ组显著高于对照组（*P*<0.05），Ⅳ组极显著高于对照组（*P*<0.01），Ⅱ和Ⅴ组与对照组差异不显著（*P*>0.05）；在试验第 14 和 28 天时，Ⅳ、Ⅴ组与对照组差异均极显著（*P*<0.01），Ⅱ、Ⅲ组与对照组差异不显著（*P*>0.05）；在试验第 21 天时，Ⅳ组显著高于对照组（*P*<0.05），其余各组与对照组没有显著差异（*P*>0.05）。

对于 *IFN*-γ 的 mRNA 相对表达量，在试验第 7 天和 21 天时，各试验组与对照组均差异极显著（*P*<0.01）；在试验第 14 天时，Ⅱ、Ⅳ组与对照组差异极显著（*P*<0.01），Ⅲ、Ⅴ组与对照组差异显著（*P*<0.05）；在试验第 28 天时，Ⅱ组与对照组差异不显著（*P*>0.05），Ⅲ、Ⅳ组与对照组差异显著（*P*<0.05），Ⅴ组与对照组差异极显著（*P*<0.01）。

表 4　*IL*-2 和 *IFN*-γ mRNA 在草鱼头肾中的相对表达量

Table 4　The relative expression levels of IL-2 and IFN-γ mRNA in head-kidney of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

基因 Genes	时间 Time	组别 Groups I	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
白介素-2 *IL*-2	第 7 天 Day 7	1	1.40±0.56	1.86±0.63*	2.84±0.22**	1.57±0.24

	第 14 天 Day 14	1	1.31±0.36	1.59±0.55	1.90±0.37**	2.19±0.22**
	第 21 天 Day 21	1	1.13±0.55	1.14±0.28	1.94±0.53*	1.69±0.60
	第 28 天 Day 28	1	1.10±0.33	1.40±0.34	2.55±0.66**	2.92±0.54**
干扰素 γ *IFN*-γ	第 7 天 Day 7	1	2.23±0.30**	1.95±0.47**	2.80±0.39**	1.91±0.38**
	第 14 天 Day 14	1	2.07±0.03**	1.51±0.48*	1.83±0.39**	1.56±0.15*
	第 21 天 Day 21	1	2.59±0.94**	3.01±0.56**	2.35±0.35**	2.07±0.57**
	第 28 天 Day 28	1	1.30±0.55	2.09±0.30*	2.00±0.51*	2.76 ±0.63**

相对于对照组，*表示差异显著（*P*<0.05），**表示差异极显著（*P*<0.01）。下表同。

Compared with control group, * showed significant difference （*P*<0.05）, and ** showed extremely significant difference （*P*<0.01）. The same as below .

2.3 玉屏风多糖对吸收相关基因 *SGLT*-1 和 *GLUT*-2 在草鱼肠道中不同时期的 mRNA 相对表达量的影响

由表 5 可知，玉屏风多糖对吸收相关基因 *SGLT*-1 和 *GLUT*-2 在草鱼肠道中不同时期的 mRNA 相对表达量具有一定的影响。

对于 *SGLT*-1 mRNA 相对表达量，在试验第 7 天时，各试验组均高于对照组，其中 II 与对照组差异不显著（*P*>0.05），Ⅲ、V组显著高于对照组（*P*<0.05），Ⅳ组极显著高于对照组（*P*<0.01）；在试验第 14 天时，II 与对照组差异不显著（*P*>0.05），Ⅲ、Ⅳ、V组均极显著高于对照组（*P*<0.01）；

在试验第 21 天时，各试验组均极显著高于对照组（$P<0.01$）；在试验第 28 天时，Ⅱ、Ⅳ组显著高于对照组（$P<0.05$），Ⅲ、Ⅴ组极显著高于对照组（$P<0.01$）。

对于 *GLUT*-2 mRNA 相对表达量，在试验第 7 天时，Ⅱ组与对照组差异不显著（$P>0.05$），Ⅲ组显著高于对照组（$P<0.05$），Ⅳ、Ⅴ组极显著高于对照组（$P<0.01$）；在试验第 14 天时，Ⅱ组与对照组差异不显著（$P>0.05$），Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ组极显著高于对照组（$P<0.01$）；在试验第 21 天时，Ⅱ、Ⅲ显著高于对照组（$P<0.05$），Ⅳ、Ⅴ组极显著高于对照组（$P<0.01$）；在试验第 28 天时，各试验组均高于对照组，但与对照组相比均差异不显著（$P>0.05$）。

表 5 *SGLT*-1 和 *GLUT*-2 在草鱼肠道中的 mRNA 相对表达量

Table 5 The relative expression levels of *SGLT*-1 and *GLUT*-2 mRNA in intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

基因 Genes	时间 Time	组别 Groups				
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
钠葡萄糖转运蛋白 1 *SGLT*-1	第 7 天 Day 7	1	1.05±0.39	1.56±0.39*	2.13±0.38**	1.72±0.05*
	第 14 天 Day 14	1	1.45±0.24	1.73±0.29**	1.94±0.40**	2.06±0.23**
	第 21 天 Day 21	1	2.34±0.27**	2.25±0.18**	2.63±0.36**	2.18±0.42**
	第 28 天 Day 28	1	1.70±0.44*	2.27±0.55**	1.82±0.24*	1.87±0.14**
葡萄糖转运蛋白 2	第 7 天 Day 7	1	1.40±0.14	1.53±0.22*	2.31±0.28**	2.39±0.38**
	第 14 天	1	1.01±0.08	1.70±0.21**	1.88±0.11**	2.07±0.25**

GLUT-2	Day 14					
	第 21 天 Day 21	1	1.52±0.17*	1.59±0.33*	2.11±0.41**	2.01±0.29**
	第 28 天 Day 28	1	1.00±0.17	1.32±0.20	1.34±0.35	1.15±0.37

3　讨　论

3.1　玉屏风多糖对草鱼肠黏膜形态结构的影响

从试验结果可以看出，投喂 14 d 后，玉屏风多糖可以降低草鱼肠黏膜隐窝深度，提高绒腺比，从而可以提高动物肠道的消化吸收能力。肠道不仅是动物机体消化吸收营养物质的重要场所，同时还具有免疫的功能，肠黏膜绒毛高度、隐窝深度、绒腺比和肌层厚度等都与肠道的消化吸收和免疫功能有密切的联系。研究表明，肠黏膜绒毛高度越高，肠道与营养物质接触的面积就越大，对营养物质的利用率就越高。通过隐窝深度可以看出隐窝细胞的增殖速度和细胞的发育程度，绒腺比是指黏膜绒毛高度与隐窝深度的比值，是肠道对营养物质吸收能力的综合反映[14]。向壔[15]指出肠道肌层厚度与肠道营养物质的消化率呈正相关关系，即肠道肌层厚度越厚，肠道对营养物质的吸收能力就越强。陶浩[16]研究发现黄芪多糖可以提高肉仔鸡十二指肠的绒毛高度、绒腺比及肌层厚度，并且可以降低隐窝深度。黄玉章等[17]研究发现黄芪多糖可以提高罗非鱼肠黏膜绒毛高度、肌层厚度，降低隐窝深度。赵燕飞等[18]研究得出白术多糖可不同程度提高断奶仔猪十二指肠和空肠的绒毛高度，加深十二指肠和空肠的隐窝深度。黄芪多糖、白术多糖为玉屏风多糖的重要组成成分，因此，可推测玉屏风多糖同样具有促进肠道隐窝细胞的成熟、加快肠绒毛上细胞的更新速度、促进细胞对营养物质的消化利用的功能。

3.2　玉屏风多糖对头肾中 *IL*-2 和 *IFN*-γ mRNA 相对表达量的影响

荧光定量 PCR 结果发现，饲料中添加 1.6 g/kg 的玉屏风多糖能显著提高草鱼头肾中 *IL*-2 mRNA 相对表达量，添加 1.2、1.6、2.0 g/kg 玉屏风多糖能显著提高草鱼头肾中 *IFN*-γ mRNA 相对表达量。Li 等[19]研究表明，给患有肾炎的小鼠注射黄芪多糖可以显著降低血液中 *IL*-2 的相对表达量，但是与

正常小鼠没有显著差异，这可能是由于小鼠患病后血液中 IL-2 的含量升高，通过黄芪多糖的作用，使含量过高的 IL-2 恢复到正常水平。Chen 等[20]研究发现黄芪多糖可以提高白罗曼公鸡血清中新城疫疫苗的抗体浓度和 IL-2 的含量，并且发现黄芪多糖和苦参碱共同作用可以显著提高血清中新城疫疫苗的抗体浓度及 IL-2 的含量。Yuan 等[21]研究发现饲粮中添加不同比例的黄芪多糖可以促进断奶仔猪血清中 *IL*-2 及 *IFN*-γ 基因的表达。卢一松等[22]研究发现从中药白术提取的多糖成分可显著提高小鼠血清中 IFN-γ 的含量。邓桦等[23]试验表明玉屏风多糖可促进小鼠红细胞免疫功能的恢复，同时可显著提高 IL-2 和 IFN- γ 含量。由此可见，在饲料中添加适宜比例的玉屏风多糖能促进草鱼头肾中 IL-2 及 IFN-γ 的生成，进而发挥免疫增强作用。

3.3　玉屏风多糖对肠道中 *SGLT*-1 和 *GLUT*-2 mRNA 相对表达量的影响

荧光定量 PCR 结果发现，饲料中添加 1.2、1.6、2.0 g/kg 玉屏风多糖均能提高草鱼肠道中 *SGLT*-1 和 *GLUT*-2 mRNA 相对表达量。葡萄糖是动物体内重要的能源物质，是新陈代谢的中间产物。葡萄糖主要在小肠中通过主动运输的方式被动物机体吸收，这个过程需要载体的参与才能完成[24]。肠道中，与葡萄糖转运相关的载体蛋白主要有 SGLT-1 和 GLUT-2[25]。已有研究表明可以通过调节 *SGLT*-1 和 *GLUT*-2 的表达来影响机体对葡萄糖的吸收[26]。相关研究表明，SGLT-1 和 GLUT-2 与葡萄糖具有相互促进的作用，肠道中的葡萄糖和类葡萄糖结构物质的增加可以提高转运蛋白的表达量[27]，SGLT-1 和 GLUT-2 表达量的提高会促进肠道对葡萄糖的吸收利用[28-29]。玉屏风多糖中含有较多的葡萄糖和阿拉伯糖、半乳糖等类葡萄糖结构物质[30]，因此可以推测肠道中玉屏风多糖能通过提高草鱼肠道中 *SGLT*-1 和 *GLUT*-2 基因的表达来加快营养物质的吸收。

4　结　论

① 在草鱼饲料中添加一定量的玉屏风多糖能改善肠黏膜形态结构，促进肠道中 *SGLT*-1 和 *GLUT*-2 基因的表达，进而提高肠道吸收功能；同时，玉屏风多糖还能通过调控头肾中 *IL*-2 和 *IFN*-γ 基因的表达，增强机体免疫力，从而提高机体免疫能力。

② 从节约饲养成本出发，草鱼饲料中玉屏风多糖最适添加量为 1.6 g/kg。

参考文献：

[1] 王清芳,杨英,周志敏,等.不同益生菌对草鱼生产性能的影响[J].养殖与饲料,2016(5):44–46.

[2] CABELLO F C,张红林,何力.水产养殖业预防性抗生素的大量使用:一个日益严重的人与动物健康以及环境问题[J].淡水渔业,2016,46(6):109–112.

[3] 焦世璋.中草药在水产养殖中的应用[J].中兽医学杂志,2016(4):73.

[4] 高建,李俊,童成亮,等.玉屏风散中总苷的制备及含量测定[J].中国中药杂志,2006,31(6):515–516.

[5] 孙文静.玉屏风多糖的制备及体内外增强免疫活性研究[D].硕士学位论文.泰安:山东农业大学,2015.

[6] 周春权,姚欣,林静瑜,等.玉屏风粗多糖的提取及药理实验[J].海峡药学,2004,16(2):38–40.

[7] 杨震,孙黎,王炜佳.防风成分的药理活性研究概况[J].黑龙江医药,2005,18(1):36–37.

[8] 崔彬,李苑松.黄芪多糖的药理研究进展[J].黑龙江科技信息,2012(15):29.

[9] 龙全江,徐雪琴,胡昀.白术的化学、药理与炮制研究进展[J].中国中医药信息杂志,2004,11(11):1033–1034.

[10] YUAN C T,PAN X P,GONG Y,et al.Effects of Astragalus polysaccharides (APS) on the expression of immune response genes in head kidney,gill and spleen of the common carp,*Cyprinus carpio* L[J].International Immunopharmacol,2008,8(1):51–58.

[11] 田允波,许丹宁,黄运茂,等.白术多糖免疫调控作用的研究进展[J].畜牧与兽医,2010,42(9):98–100.

[12] 朱南山,张彬,李丽立,等.白术多糖对仔猪血淋巴细胞转化及信号转导相关分子的影响[J].华北农学报,2007,22(2):18–21.

[13] 高鸿霞,邵世和,王国庆.中药防风的研究进展[J].井冈山医专学报,2004,11(4):12–14.

[14] 黄玉章.黄芪多糖对奥尼罗非鱼生长性能和免疫功能的影响[D].硕士学位论文.福州:福建农林大学,2009.

[15] 向壔.家畜生理学原理[M].北京:农业出版社,1990.

[16] 陶浩.黄芪多糖对肉仔鸡肠道发育及抗氧化能力的影响[D].硕士学位论文.长春:吉林农业大学,2012.

[17] 黄玉章,林旋,王全溪,等.黄芪多糖对罗非鱼肠绒毛形态结构及肠道免疫细胞的影响[J].动物营养学报,2010,22(1):108–116.

[18] 赵燕飞,汪以真.白术、微米白术和白术多糖对断奶仔猪生长性能和肠道形态及微生态区系的影响[J].中国畜牧杂志,2015,51(1):65–69.

[19] LI S G,ZHANG Y Q,ZHAO J X.Preparation and suppressive effect of astragalus polysaccharide in glomerulonephritis rats[J].International Immunopharmacology,2007,7(1):23–28.

[20] CHEN Y K,WANG D Y,HU Y L,et al.Astragalus polysaccharide and oxymatrine can synergistically improve the immune efficacy of Newcastle disease vaccine in chicken[J].International Journal of Biological Macromolecules,2010,46(4):425–428.

[21] YUAN S L,PIAO X S,LI D F,et al.Effects of dietary *Astragalus* polysaccharide on growth performance and immune function in weaned pigs[J].Animalence,2006,82(4):501–507.

[22] 卢一松,徐伟,张岑容,等.含白术多糖油乳剂对口蹄疫疫苗免疫的增强作用[J].中国兽医学报,2016,36(6):928–932.

[23] 邓桦,杨鸿,仝锡瑶,等.玉屏风多糖对免疫抑制小鼠红细胞免疫功能的影响[J].中国兽医杂志,2016,53(2):56–58.

[24] 张敏,孙权,周嘉恒,等.维持机体糖稳态及葡萄糖的感受器:小肠葡萄糖转运体2研究进展[J].中国糖尿病杂志,2016,8(9):571–573.

[25] ABBASI N N,PURSLOW P P,TOSH S M,et al.Oat β-glucan depresses SGLT1-and GLUT2-mediated glucose transport in intestinal epithelial cells (IEC-6)[J].Nutrition Research,2016,36(6):541–552.

[26] 段娟慧,巫冠中.SGLT1/SGLT2 双重抑制剂-Sotagliflozin 的研究概况[J].中南药学,2015,13(9):947–950.

[27] ENGELHARDT W V,LEONHARDMAREK S,BREVES G,et al.Ruminant physiology:digestion,metabolism,growth and reproduction[C]//Proceedings of the Eighth

International Symposium on Ruminant Physiology.[s.n.],1995.

[28] HUI D Y,HAYAKAWA K,OIZUMI J.Lipoamidase activity in normal and mutagenized pancreatic cholesterol esterase (bile salt-stimulated lipase)[J].Biochemical Journal,1993,291(1):65–69.

[29] YASUTAKE H,GODA T,TAKASE S.Dietary regulation of sucrase-isomaltase gene expression in rat jejunum[J].Biochimica et Biophysica Acta：General Subjects,1995,1243(2):270–276.

[30] 黄樱华,黄月纯,张素中.玉屏风汤剂多糖乙酰化物GC特征图谱研究[C]//2010年广东省药师周大会论文集.广州:广东省药学会,2011.

Effects of *Yupingfeng* Polysaccharide on Morphology of Intestinal Mucosa and Expression of Main Immune and Absorption Genes of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

YIN Fuquan[1] WU Yongliang[2] LIU Mingzhu[1,3] TAN Shuwen[2] YANG Ying[2] YU Hui[2*]

(1. *College of Agricultural*, *Guangdong Ocean University*, *Zhanjiang* 524088, *China*; 2. *College of Life Science and Engineering*, *Foshan University*, *Foshan* 528231, *China*; 3. *Guangzhou Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences*, *Guangzhou* 511458, *China*)

Abstract: This experiment was designed to investigate the effects of *Yupingfeng* polysaccharide on morphology of intestinal mucosa and expression of main immune and absorption genes of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). A total of 750 healthy grass carp with an average body weight of (74.50±2.50) g were randomly assigned to 5 groups with 3 replicates per group and 50 fish per replicate. The first group (group Ⅰ) was the control group and fed a basal diet, and the remaining four groups (groups Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ) were experimental groups and fed experimental diets supplementing 0.8, 1.2, 1.6 and 2.0 g/kg *Yupingfeng* polysaccharide based on the basal diet, respectively. The pre-trial period was 7 days, and the formal trial period was 28 days. The results showed as follows: 1) feeding for 14 days, the crypt depth of group Ⅴ was significantly lower than that of control group (P<0.05), and the villus height/crypt depth of group Ⅴ was significantly higher than that of control group (P<0.05). 2) On the trial day 7, compared with the control group, the relative expression level of interleukin-2 (*IL*-2) mRNA in head-kidney of groups Ⅲ and Ⅳ was significantly or extremely significantly increased (P<0.05 or P<0.01), the relative expression level of interferon γ (*IFN*-γ) mRNA in head-kidney of groups Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ was extremely significantly increased (P<0.01), and the relative expression levels of sodium glucose transporter 1 (*SGLT*-1) and glucose transport protein 2 (*GLUT*-2) mRNA in intestine of groups Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ were significantly or extremely significantly increased (P<0.05 or P<0.01). 3) On the trial day 14, compared with the control group, the relative expression level of *IL*-2 mRNA in head-kidney of groups Ⅳ and Ⅴ was

*Corresponding author, professor, E-mail: yu71hui@126.com (责任编辑 菅景颖)

extremely significantly increased (P<0.01), the relative expression level of *IFN*-γ mRNA in head-kidney of groups Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ was significantly or extremely significantly increased (P<0.05 or P<0.01), and the relative expression levels of *SGLT*-1 and *GLUT*-2 mRNA in intestine of groups Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ were extremely significantly increased (P<0.01). 4) On the trial day 21, compared with the control group, the relative expression level of *IL*-2 mRNA in head-kidney of group Ⅳ was significantly increased (P<0.05), the relative expression level of *IFN*-γ mRNA in head-kidney of groups Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ was extremely significantly increased (P<0.01), and the relative expression levels of *SGLT*-1 and *GLUT*-2 mRNA in intestine of groups Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ were significantly or extremely significantly increased (P<0.05 or P<0.01). 5) On the trial day 28, compared with the control group, the relative expression level of *IL*-2 mRNA in head-kidney of groups Ⅳ and Ⅴ was extremely significantly increased (P<0.01), the relative expression level of *IFN*-γ mRNA in head-kidney of groups Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ was significantly or extremely significantly increased (P<0.05 or P<0.01), and the relative expression levels of *SGLT*-1 and *GLUT*-2 mRNA in intestine of groups Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ were significantly or extremely significantly increased (P<0.05 or P<0.01). On the whole, supplementing a certain amount of *Yupingfeng* polysaccharide in the diet can improve the morphology of intestinal mucosa, promote the expression of *sglt*-1 and *glut*-2 genes in intestine, regulate the expression of *IL*-2 and *IFN*-γ genes in head-kidney, and then improve the intestinal absorption function and immunity of grass carp. In consideration of saving cost, the optimum supplemental level *Yupingfeng* polysaccharide in the diet of grass carp is 1.6 g/kg

Key words: grass carp; *Yupingfeng* polysaccharide; intestinal villus; IL-2; IFN-γ; SGLT-1; GLUT-2